

Aus der Frauenklinik der Justus Liebig-Universität Gießen

Direktor: Professor Dr. R. Kepp

Hormonelle Beeinflussung der alkalischen Leukozytenphosphatase bei der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des
Bereichs Humanmedizin
der
Justus Liebig-Universität
Gießen

vorgelegt von

Irmgard Fehring

aus Moers

Gießen

1972

Aus der Frauenklinik der Justus Liebig-Universität Gießen

Direktor: Professor Dr. R. Kepp

Hormonelle Beeinflussung der alkalischen Leukozytenphosphatase bei der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des
Bereichs Humanmedizin
der
Justus Liebig-Universität
Gießen

vorgelegt von

Irmgard Fehring
aus Moers

Gießen

1972

Dekan: Professor Dr. med. Hj. Staudinger

Referent: Professor Dr. med. P. Bailer

Korreferent: Professor Dr. med. H. Löffler



Inhaltsverzeichnis

	Seite
1.0 Einleitung	4
2.0 Literaturübersicht	6
3.0 Fragestellung	15
4.0 Eigene Untersuchungen	18
4.1 Material	18
4.11 Versuchstiere	18
4.12 Applizierte Substanzen	18
4.2 Methodik	18
4.21 Versuchsanordnung	18
4.22 Arbeitsgang	23
5.0 Ergebnisse	27
5.1 Statistische Berechnungen	27
5.2 Tierexperimentelle Untersuchungen	29
6.0 Diskussion	51
7.0 Zusammenfassung	56
8.0 Literaturverzeichnis	59

1.0 Einleitung

Die alkalische Leukozytenphosphatase gehört zu der Enzymgruppe der alkalischen Phosphatasen (AP) und ist eines der am längsten bekannten Enzyme dieser Gruppe. Die alkalische Leukozytenphosphatase (ALP) wurde erstmals 1907 von Suzuki et al. (52) beschrieben. Zu ihren Funktionen gehören die Hydrolyse von Phosphorsäuremonoestern und polymerisierten Nukleinsäuren in alkalischem Milieu, außerdem die Steuerung von Synthese- und Transphosphorylierungsvorgängen innerhalb des Zellstoffwechsels.

Mit biochemischen und histochemischen Untersuchungsmethoden konnte die ALP in Zellen nachgewiesen werden. Sie wurde hauptsächlich in den polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten gefunden, wie es schon 1929 Kay (23) vermutet hatte (14, 17, 42, 59, 64, 65).

Wachstein (62) gelang es 1946, mit einem zytochemischen Verfahren für "alkalische" Phosphomonoesterasen an Blutausstrichen die hydrolytischen Enzyme, u.a. die ALP, in morphologisch erhaltenen Zellen topochemisch nachzuweisen.

Zahlreiche Veröffentlichungen über die ALP geben Einblick in ihr Verhalten bei physiologischen und pathologischen Vorgängen und nach Einwirkung verschiedener Substanzen

im menschlichen und tierischen Organismus. Diese Publikationen lassen der ALP-Aktivitätsbestimmung auf verschiedenen Gebieten der Medizin eine diagnostische Bedeutung zukommen.

2.0 Literaturübersicht

Um die enzymatische Aktivität der alkalischen Leukozytenphosphatase in den reifen, polymorphkernigen, neutrophilen Leukozyten zu bestimmen, werden zur Zeit zwei Methoden angewandt.

Die erste Methode ist die chemisch-analytische nach Bessey-Lowry (18), bei der die Extinktion eines inkubierten Leukozytenhomogenats entsprechend der Formel nach Bessey-Lowry in ALP-Einheiten umgerechnet wird. Der Nachteil dieser Methode besteht in der äußerst schwierigen Gewinnung eines funktionstüchtigen Leukozytenkonzentrates, da die Leukozyten schon während der Aufbereitung an physiologischen Eigenschaften und Lebensfähigkeit verlieren.

Die zweite Methode ist die zytochemische, bei der die hydrolytische Funktion des Enzymes zur Darstellung der Phosphataseaktivität innerhalb der morphologisch intakten Zelle benutzt wird.

Drei unterschiedliche Verfahren werden zum zytochemischen Nachweis der ALP-Aktivität angewandt. Die von Barnett et al. (4) und Holt (20) entwickelte Indoxyl-Methode wird bisher in der Hämatologie nicht so weit verbreitet benutzt wie die beiden folgenden Verfahren.

1939 entwickelten Gomori (16) und Takamatsu (53) unabhängig voneinander die sogenannte Sukzedan-Methode. Hierbei werden sowohl die hydrolytische Funktion des Enzyms als auch seine bemerkenswerte Unspezifität - das Substrat betreffend - benutzt, um die hydrolytisch abgespaltene Phosphatgruppe verschiedener Substrate als chromogene Vorstufe zu gewinnen. Über die Zwischenstufen Calciumphosphat und Kobaltphosphat wird das schwarzgefärbte Endprodukt Kobaltsulfid am Ort der Enzymaktivität innerhalb des Zytoplasmas gebildet. Die Intensität des Farbstoffniederschlags wird als direkter Gradmesser der Enzymaktivität gewertet.

Neben der sogenannten Sukzedan-Methode kommt das Azokupplungsverfahren als Simultanverfahren zur Anwendung. Es scheint wegen der kürzeren Inkubationszeit, Prägnanz, Lokalisationstreue des Farbpräparates und besserer quantitativer Auswertungsmöglichkeiten für die Klinik am geeignetesten zu sein.

Das Azokupplungsverfahren beruht darauf, daß durch die Phosphatase ein synthetisches Substrat (Phosphorsäure- α -Naphthylester) gespalten und unmittelbar darauf mit einem Diazoniumsalz (Variamin-Blausalz B conc.) zu einem Azofarbstoff verbunden wird. Dieses Verfahren geht auf Menten, Junge u. Green (30) zurück und wurde von Merker und Heilmeyer (32) und Bauer-Sic (5) modifiziert.

Über die physiologischen Werte der ALP-Aktivität beim Menschen existieren bisher nur wenige Veröffentlichungen. Diese besagen, daß bei gesunden Individuen in der Zeitspanne zwischen Geburt und Pubertät höhere Normalwerte als beim Erwachsenen gefunden werden. Zu diesem Ergebnis kamen Untersucher, die unterschiedlich modifizierte Azokupplungsverfahren sowie biochemische Methoden anwandten (33, 38, 46, 47). Die Normalwerte beim Azokupplungsverfahren liegen beim Säugling und Kleinkind zwischen 90 und 150, beim Erwachsenen zwischen 40 und 100 (38). Untersucht man die ALP-Werte Erwachsener nach Geschlechtern getrennt, so stellt man fest, daß die Enzymaktivität bei geschlechtsreifen Frauen wesentlich höher liegt als bei Männern, die ALP-Werte beider Geschlechter vor der Pubertät und nach der Menopause jedoch übereinstimmen (47).

Während des Zyklus unterliegt die ALP-Aktivität deutlichen Schwankungen. Der Tiefstwert wird während der Menstruation festgestellt (35), der Höchstwert dagegen zum Zeitpunkt der Ovulation (5).

Untersuchungen des ALP-Verhaltens unter der Schwangerschaft haben einen physiologischen Aktivitätsanstieg ergeben (31, 9). Haering (19) und Quigley (40) verfolgten das ALP-Verhalten in der Schwangerschaft, unter der Geburt und im Wochenbett. Entsprechend ihren Befunden nimmt die ALP-Aktivität vom 2. Schwangerschaftsmonat an

stetig zu, um unter der Geburt den Maximalwert zu erreichen. Während des Wochenbetts fallen die Aktivitätswerte kontinuierlich ab, um 6 Wochen post partum die Normalwerte wieder zu erreichen.

Einige Autoren verstehen dieses typische Verhalten als zusätzliche Möglichkeit, eine bestehende Schwangerschaft zu diagnostizieren bzw. auszuschließen (49, 11). Haering (19) lehnt diese Methode des Schwangerschafts-Test aufgrund ihrer Unspezifität jedoch ab.

Einen diagnostischen Wert hat die ALP-Bestimmung bei einigen pathologischen Zuständen des menschlichen Organismus erlangt.

Die meisten Untersuchungen über die ALP liegen auf dem Gebiet der INNEREN MEDIZIN vor, speziell in der Hämatologie. Wachstein (62) hatte schon 1946 beobachtet, daß die chronische Myelose fast stets mit einer stark erniedrigten ALP-Aktivität einhergeht. Kaplow (10) stellte mit einer halbquantitativen histochemischen Methode bei der chronischen Myelose eine Erniedrigung der Phosphataseaktivität mit einem Mittelwert von 28 fest. Die Osteomyelosklerose jedoch, die nach ihrer klinischen Symptomatik von der chronischen Myelose oft schwer zu unterscheiden ist, wies mit einem Mittelwert von 266 eine deutliche Erhöhung der ALP-Aktivität auf.

Diese Untersuchungsergebnisse wurden von anderen Autoren bestätigt und ermöglichten somit die Differentialdiagnose der beiden Krankheiten (10, 24, 25, 26, 32, 45, 57, 63).

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß auch andere Erkrankungen des hämatopoetischen Systems mit charakteristischen Veränderungen der ALP-Aktivität einhergehen.

So läßt sich die Polyzythämia vera, bei der die ALP-Werte in der Regel stark erhöht sind, von der sekundären Polyglobulie mit Werten im bzw. unter dem Normalbereich, differentialdiagnostisch abgrenzen (25, 27, 45, 51).

Der Krankheitsverlauf des M. Hodgkin läßt sich indirekt anhand der ALP-Aktivität verfolgen. Das aktive Stadium ist durch hohe Werte charakterisiert. Fallen die Werte unter der Therapie ab, so spricht dies für einen Therapieerfolg; steigen die Werte wieder an, so muß mit einem Rezidiv gerechnet werden (6, 15, 24, 45, 63).

Außer in der HÄMATOLOGIE hat die ALP-Bestimmung einen diagnostischen Wert bei Lebererkrankungen, allerdings gehen hier die Meinungen der verschiedenen Autoren auseinander. Lambers und Bauer-Sic (27) berichten über erhöhte ALP-Werte bei extrahepatischem Verschluß-

ikterus und Leberzirrhose, überwiegend erniedrigte Werte bei Hepatitis epidemica und cholestatischer Hepatose. Immel und Tilling (21) fanden bei ihren Untersuchungen keinen Hinweis für den differentialdiagnostischen Wert der ALP-Bestimmung bei Verschlußikterus, Hepatitis epidemica und Leberzirrhose. Sie stellten durchweg ein regelloses Schwanken der Fermentaktivität fest. Zu denselben Ergebnissen wie Immel und Tilling (21) kamen Nowicki und Wernze (36). Diese Autoren berichten zusätzlich über erhöhte Aktivitäten bei Cholangio-Hepatitis und Tumoren mit Leber- und Knochenmetastasen.

In der PÄDIATRIE wurde das ALP-Verhalten vorwiegend bei Infektionskrankheiten untersucht. Bei reinen Virusinfektionen beobachteten Sramkova et al. (46, 48) keinerlei ALP-Anstieg, dagegen sahen sie bei Virusinfektionen mit sekundär bakterieller Komplikation und primär bakterieller Infektion erhöhte ALP-Werte. Die Bestimmung der ALP-Aktivität kann also in der Differentialdiagnose einiger bakterieller Erkrankungen und Virusinfektionen, außerdem zur Unterscheidung primärer von sekundären Komplikationen einiger Viruskrankheiten herangezogen werden (46,48).

Beim Langdon-Down-Syndrom (Trisomie des Chromosoms 21) fanden mehrere Autoren übereinstimmend eine erhöhte ALP-Aktivität (1, 55, 65).

Auch auf dem Fachgebiet der GYNÄKOLOGIE und GEBURTSHILFE hat die Bestimmung der ALP bei pathologischen Vorgängen einen gewissen diagnostischen Wert erlangt. Beretta (7) untersuchte die ALP-Aktivität bei 11 Frauen mit extra-uteriner Gravidität und fand Werte, die wesentlich niedriger lagen als bei normaler Schwangerschaft des gleichen Stadiums, aber höher als bei Nichtschwangeren. Er schloß daraus, daß die Bestimmung des ALP-Spiegel als zusätzliches diagnostisches Hilfsmittel zur Feststellung einer extrauterinen Gravidität herangezogen werden könne.

Staff et al. (50) konnten diesen Befund allerdings nicht bestätigen, da sie bei 5 von 6 Frauen mit extrauteriner Gravidität dieselben Werte wie bei Frauen mit intra-uteriner Gravidität fanden.

Von Sadovsky et al. (43) liegen Untersuchungen über die ALP-Indices präeklamptischer Patientinnen vor. Die Autoren stellen fest, daß ein niedriger ALP-Spiegel der Präeklampsie vorausgeht und während der Erkrankung andauert. Ein plötzlicher Anstieg der ALP-Aktivität deutet auf eine bedrohliche Gefährdung des Kindes hin.

Haering (19) berichtet von 2 Patientinnen mit Blasenmole, bei denen die ALP-Indices mit Werten von 355 und 360 stark erhöht waren.

Der Einfluß exogener und endogener Substanzen auf die ALP wurde von mehreren Autoren untersucht. Merker (31) applizierte Pyrexal^R und bewirkte damit bei gesunden Probanden zunächst einen fast vollständigen ALP-Schwund, innerhalb der folgenden 36 Stunden kam es zu einem maximalen Anstieg und während der folgenden 1-2 Tage zu einem kontinuierlichen Abfall auf Normalwerte.

Beim Gesunden ist dieses Verhalten als gesetzmäßiger Ablauf nach Applikation von bakteriellen Endotoxinen zu werten.

Die relativ zögernde Reaktion der ALP-produzierenden Zellen auf verschiedene Eingriffe in die Physiologie des menschlichen und tierischen Organismus legt eine Steuerung durch humorale Faktoren nahe. Valentine (58, 60) untersuchte als erster das ALP-Verhalten in Stress-Situationen wie: schwere Traumata und Operationen, Schwangerschaft und Geburt. Er konnte den Anstieg der ALP-Indices reproduzieren durch ACTH-Gabe, aber nur in geringem Ausmaß durch hohe Gaben von Cortisonacetat und Hydrocortison.

Plenert (37) konnte hingegen in vitro nach ACTH-, Hydrocortison und Prednisolon-Applikation keine Steigerung der ALP-Aktivität erzielen. Grundsätzlich führte Prednison zu einem Aktivitätsanstieg; bei ausgeprägter

Granulozytose wurde die ALP-Aktivität unter hoher Prednison-Dosis stark vermindert, stieg unter Reduktion der Dosis erheblich an, um nach Absetzen für längere Zeit auf subnormale Werte abzufallen.

Ein ähnliches Verhalten der ALP zeigt sich bei Endoxan-Therapie (34). Nach intravenösem Endoxanstoß steigt die Aktivität innerhalb der ersten 3 Tage an, nach 5 Tagen folgt ein teilweise ausgeprägter Aktivitätsverlust und vom 8. Tag an ein z.T. übermäßiger Anstieg der ALP-Aktivität. Die primäre Aktivitätsvermehrung wird in ihrem Mechanismus der nach Pyrogen-Reiz gleichgesetzt.

Über die ALP-Aktivitätswerte bei Tieren liegen bisher noch wenige Arbeiten vor. Lorbacher et al. (29) untersuchten das Verhalten der ALP bei experimentellen Tumoren, d.h. Hepatomen und Gehörgangskarzinomen der Ratte. Diese Tumoren führten zu einem deutlichen Anstieg der Enzymaktivität. Dagegen waren die Enzymwerte bei subcutan überimpften Yoshida-Sarkomen gleichbleibend bis zum eitrigen Zerfall, um danach sprunghaft anzusteigen.

Ebadi und Mc Coy (12) untersuchten das Verhalten der ALP bei weißen, männlichen Kaninchen nach Applikation verschiedener Steroide; darunter war Progesteron das effektivste. Es führte 24 Stunden nach Applikation zu einem 17-fachen Anstieg der Enzymaktivität.

3.0 Fragestellung

Die bei Mann und Frau im geschlechtsreifen Alter unter physiologischen Umständen festgestellten ALP-Aktivitäten weisen signifikante Unterschiede auf. Diese Tatsache und die ALP-Aktivitätsänderung während des weiblichen Zyklus und im Verlauf der Schwangerschaft legen die Vermutung nahe, daß die weiblichen Geschlechtshormone in der Lage sind, einen Einfluß auf die ALP-Aktivität auszuüben.

Die Untersuchungen von Bauer-Sic (4) weisen darauf hin, daß unter den weiblichen Geschlechtshormonen den Östrogenen eine bevorzugte oder sogar alleinige Rolle im Hinblick auf die ALP-Aktivitätsbeeinflussung zukommt.

Polishuk et al. (39) konnten bei Frauen in der Menopause nach Östrogenzufuhr ebenfalls einen Anstieg der ALP-Aktivität feststellen; Progesteronapplikation allein jedoch bewirkte keine Änderung der Enzymaktivität.

Sammour et al. (44) untersuchten den ALP-Index unter dem Einfluß von Antikonzeptiva mit unterschiedlich hohen Progesteron- bzw. Östrogenkomponenten. Aufgrund

der Progesteronkomponente eines Zweiphasen-Präparates wiesen sie am dritten Tag nach Applikation einen ALP-Gipfel nach, während sie unter erhöhter Östrogen-Dosis einen Aktivitätsabfall verzeichneten.

Die Tierversuche von Ebadi u. Mc. Coy (12) legen nahe, dem Progesteron ebenfalls den alleinigen Einfluß auf die durch weibliche Geschlechtshormone hervorgerufenen ALP-Aktivitätsänderungen zuzusprechen.

Diese unterschiedlichen Literaturangaben waren der Anlaß, der Frage weiter nachzugehen, welches der beiden weiblichen Geschlechtshormone im Tierexperiment vorrangig die Aktivität der alkalischen Leukozytenphosphatase beeinflusst.

Polishuk et al. (39) hatten gleichzeitig Östrogen und Progesteron verabreicht und waren aufgrund der Untersuchungsergebnisse zu dem Schluß gekommen, daß möglicherweise in bezug auf die ALP-Aktivität zwischen Östrogen- und Progesteronwirkung ein gewisser Antagonismus bestehe.

Diese Fragestellung wird als zweiter Punkt in der vorliegenden Untersuchung aufgegriffen.

Borel et al. (9) beschrieben einen massiven ALP-Aktivitätsanstieg bei Männern nach Applikation von Östradiol. An männlichen Tieren soll im Experiment untersucht werden, ob unter Östradiolgabe eine Änderung der ALP-Aktivität eintritt.

Zusammenfassend lassen sich folgende Fragen stellen:

1) Läßt sich bei weiblichen und männlichen Ratten experimentell durch Östrogen oder Progesteron, allein oder gemeinsam appliziert, eine Aktivitätszunahme der ALP auslösen?

2) Besteht ein Antagonismus zwischen Östrogenen und Progesteron in bezug auf ihre Beeinflussung der ALP-Aktivität?

Gumbrecht u. Loeser (18) zeigten im Tierversuch, daß ein Regelkreis zwischen Ovar und Schilddrüse besteht. Da sich nach Meinung der Autoren die Östrogenwirkung auf die Schilddrüse nach Passage der Östrogene durch den Uterus ändert, werden die weiblichen Ratten für die vorliegende Untersuchung hysterektomiert. Die Ovariectomie wird zusätzlich vorgenommen, um einen konstanten Hormonspiegel zu gewährleisten.

4.0 Eigene Untersuchungen

4.1 Material

4.11 Versuchstiere

Als Versuchstiere werden gleichaltrige männliche und weibliche Albinoratten desselben Stammes benutzt. Die Tiere wiegen zwischen 150 und 300 g. Sie werden unter denselben Versuchsbedingungen gehalten.

4.12 Applizierte Substanzen

4.121 Östradiolbenzoat (Progynon^R)

4.122 Progesteron (Proluton^R)

4.123 Östradiolbenzoat + Progesteron

4.124 Olivenöl

4.2 Methodik

4.21 Versuchsanordnung

36 weibliche und 31 männliche Ratten werden in sieben Kollektive unterteilt:

Kollektiv I

4 weibliche Ratten

(Zustand nach Hysterektomie und Ovariektomie)

s.c. Injektion von

0,0005 mg Östradiolbenzoat (Progynon^R B oleosum)

ad 1,0 ml Olivenöl

an fünf aufeinanderfolgenden Tagen

Kollektiv II

10 weibliche Ratten

(Zustand nach Hysterektomie und Ovariektomie)

s.c. Injektion von

0,002 mg Östradiolbenzoat

ad 1,0 ml Olivenöl

an fünf aufeinanderfolgenden Tagen

Kollektiv III

10 weibliche Ratten

(Zustand nach Hysterektomie und Ovariektomie)

s.c. Injektion von

0,002 mg Östradiolbenzoat

+ 1,0 mg Progesteron

ad 1,0 ml Olivenöl

an fünf aufeinanderfolgenden Tagen

Kollektiv IV

11 weibliche Ratten

(Zustand nach Hysterektomie und Ovariectomie)

s.c. Injektion von

1,0 ml Olivenöl

an fünf aufeinanderfolgenden Tagen

Kollektiv V

10 männliche Ratten

s.c. Injektion von

0,002 mg Östradiolbenzoat

ad 1,0 ml Olivenöl

an fünf aufeinanderfolgenden Tagen

Kollektiv VI

11 männliche Ratten

s.c. Injektion von

0,002 mg Östradiolbenzoat

+ 1,0 mg Progesteron

ad 1,0 ml Olivenöl

an fünf aufeinanderfolgenden Tagen

Kollektiv VII

10 männliche Ratten

s.c. Injektion von

1,0 ml Olivenöl

an fünf aufeinanderfolgenden Tagen

Vor Beginn der Untersuchungen werden alle weiblichen Versuchstiere in Äthernarkose hysterektomiert und ovariectomiert.

Praeoperativ wird von jeder Ratte an drei aufeinanderfolgenden Tagen der ALP-Index zytochemisch bestimmt; das arithmetische Mittel dieser drei Werte bedeutet jeweils den Ausgangswert.

Postoperativ steigen infolge des Operationsstresses die ALP-Indices kurzfristig an, um langsam wieder in den Bereich der Normalwerte abzufallen. Diese Änderung der ALP-Aktivität wird im Abstand von zwei Tagen verfolgt, bis die Ausgangsaktivität wieder erreicht ist, bzw. die Enzymaktivität an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen nicht weiter absinkt.

Den Tieren des Kollektivs I werden, nachdem der Ausgangswert an drei aufeinanderfolgenden Tagen vor der ersten Injektion bestimmt wurde, an fünf aufeinanderfolgenden Tagen 0,0005 mg Östradiolbenzoat ad 1,0 ml Olivenöl injiziert.

Die Verdünnung mit Olivenöl erfolgt, um bei den geringen Hormonkonzentrationen injizierbare Volumina zu erhalten.

Die Enzymaktivität wird nach der Hormonapplikation kontrolliert, bis die Ausgangswerte wieder erreicht sind, bzw. die Indices sich an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen nicht mehr ändern.

Den Ratten der Kollektive II und V werden - ebenfalls nach Bestimmung der Normalwerte - an fünf aufeinanderfolgenden Tagen 0,002 mg Östradiolbenzoat ad 1 ml Olivenöl subcutan injiziert. Die ALP-Aktivitätskontrollen werden wie beschrieben vorgenommen.

Die Ratten der Kollektive III und VI erhalten nach Bestimmung der Ausgangswerte jeweils eine Injektion von 0,002 mg Östradiolbenzoat, gemeinsam mit 1,0 mg Progesteron ad 1,0 ml Olivenöl während der fünf folgenden Tage. Wiederum werden die ALP-Indices bis zum Erreichen der Ausgangswerte bestimmt.

Den Vergleichskollektiven IV und VII wird - ebenfalls an fünf aufeinanderfolgenden Tagen - 1,0 ml Olivenöl subcutan appliziert.

4.22 Arbeitsgang

Die Blutabnahme erfolgt durch Lanzettstich in die mit Alkohol desinfizierte Schwanzspitze der Versuchstiere. Der erste Blutropfen wird abgetupft, der zweite und dritte mit einem Deckgläschen auf entfettete und polierte Objektträger aufgetragen.

Zur z y t o c h e m i s c h e n Bestimmung der ALP-Aktivität wird das von Menten et al. (30) beschriebene, nach Merker u. Heilmeyer (32) und Bauer-Sie (5) modifizierte Azokupplungsverfahren angewandt:

- 1) Fixation der luftgetrockneten Blutaussstriche in Formoldampf bei 20°C über 15 min. Die Ausstriche werden anschließend unter fliessendem Wasser gespült und an der Luft getrocknet.
- 2) Inkubation über 120 min bei 4°C in frisch angesetzter Substratmischung. Diese hat einen pH-Wert von 9,4 und setzt sich zusammen aus:
 - 70 mg Phosphorsäure-*L*-naphtylester (Th. Schuchardt)
 - 100 ml 2 %igem Barbital-Natrium (E. Merck) gelöst,
 - 140 mg Variaminblausalz B konz. (Hoechst) in
 - 40 ml 2 %igem Barbital-Natrium gelöst. Die beiden Lösungen werden gemischt und durch 2 Schleicher-Schüll-Schwarzband-Filterpapiere filtriert. Anschliessend Spülen unter fliessendem Wasser und an der Luft Trocknen.

3) Gegenfärbung über 8 min in Hämalaun (Meyer).

Spülen unter fliessendem Wasser, Lufttrocknung.

4. Eindecken der Präparate in Glycerin-Gelatine

Auswerten der Präparate

Die Präparate werden mittels Ölimmersion bei 1000-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch ausgewertet.

100 stab- und segmentkernige neutrophile Granulozyten werden ausgezählt und entsprechend der Intensität des Farbstoffniederschlags in sechs Reaktionsklassen von 0 - 5 eingeteilt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Beispiel für die Berechnung des Phosphatase-Index

Reaktionsklasse = Klassenfaktor	Anzahl der Neutrophilen	Multiplikations- faktor	Phosphatase- Aktivität
0	8	0	0
1	20	1	20
2	22	2	44
3	45	3	135
4	3	4	12
5	2	5	10
Phosphatase-Index			221

Die Auswertung entspricht annähernd der von Merker u. Heilmeyer (32) beschriebenen Klassifizierungsmethode:

0 = Fehlende Reaktion

1 = Geringe, aber deutlich sichtbare braune Farbstoffniederschläge, im Zellzentrum beginnend, diffus oder granulär.

2 = Nichthomogene Farbstoffniederschläge, den Zytoplasmarand noch freilassend, aber zur Peripherie hin fortschreitend.

3 = Homogen verteilte, meist granuläre Niederschläge in der ganzen Zelle, Zytoplasma noch transparent abgrenzbar.

4 = Fleckweise schwarze Farbstoffniederschläge, die Transparenz in diesen Gebieten schwindet, Kern noch gut erkennbar.

5 = Homogene Ausfüllung der ganzen Zelle mit schwarzen Farbstoffniederschlägen ohne jede Transparenz, Zellkern teils überlagert, teils noch erkennbar.

Berechnung des Phosphatase-Index

Die Summe der in die verschiedenen Klassen eingeordneten Zellen wird mit dem jeweiligen Klassenfaktor multipliziert; das Produkt ist identisch mit dem Aktivitätsindex (Abb. 1).

Der Aktivitätsbereich liegt entsprechend zwischen 0 (fehlende Aktivität) und 500 (maximale Aktivität aller ausgezählten Granulozyten).

Um subjektive Fehlerquellen zu mindern, werden bei jeder Blutentnahme von jedem Tier zwei Blutaussstriche angefertigt und pro Präparat 50 neutrophile Granulozyten ausgezählt und bewertet.

Die Summe der Aktivitätsindices ergibt den jeweils angeführten Aktivitätsindex.

5.0 Ergebnisse

5.1 Statistische Berechnungen*

Die statistische Berechnung der Ergebnisse erfolgte, sofern nicht ausdrücklich vermerkt, mit mehrfachen Varianzanalysen nach dem Winer'schen Modell.

Geprüft wurden:

- 1) Zeitliche Änderungen der Kurven.
- 2) Paralleler Verlauf von Kurven verschiedener Gruppen.
- 3) Unterschiede zwischen den Gesamtmittelwerten der Gruppen.

Falls Kurven verschiedener Gruppen parallel verliefen und keine Unterschiede der Gesamtmittelwerte bestanden, wurden die Kurvenverläufe als gleichartig betrachtet.

Die Streubreite der Einzelwerte (Standardabweichung) wurde nach der Formel

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

berechnet.

Für die Berechnung des mittleren Fehlers der Mittelwerte galt die Formel

$$s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

* Herrn Professor Dr. J. Dudeck, Direktor des Instituts für Medizinische Statistik und Dokumentation an der Universität Giessen, bin ich für Beratung und Vornahme der statistischen Berechnungen zu Dank verpflichtet.

5.2 Tierexperimentelle Untersuchungen

Ein weibliches Tier des Kollektivs I zeigte postoperativ eine Gewichtszunahme um das Doppelte gegenüber den übrigen Tieren; ein weiteres aus Kollektiv IV hatte während des gesamten Versuchverlaufs eine schlecht heilende Schwanzwunde; ein drittes männliches Tier des Kollektivs VI wies über zwei Wochen einen fieberhaften Infekt auf. Diese drei Tiere werden in den Abbildungen und Tabellen nicht aufgeführt, da schon die Ausgangswerte weit oberhalb derjenigen des übrigen Kollektivs lagen.

Kollektiv I

Der mittlere Ausgangsindex beträgt postoperativ vor der Hormonapplikation 178 Index-Einheiten. Bereits 24 Stunden nach der Verabfolgung von 0,0005 mg Östradiolbenzoat zeigt sich ein mittlerer Anstieg um 10 Einheiten. Das Index-Maximum wird mit einem Mittelwert von 223 Einheiten zwei Tage nach der letzten Injektion erreicht. Vier Tage später liegen die Werte wieder im Normbereich. Der Maximalwert entspricht im Vergleich zum Normalwert einer Steigerung um etwa 30 Prozent.

(Abb. 1, Tab. II und III)

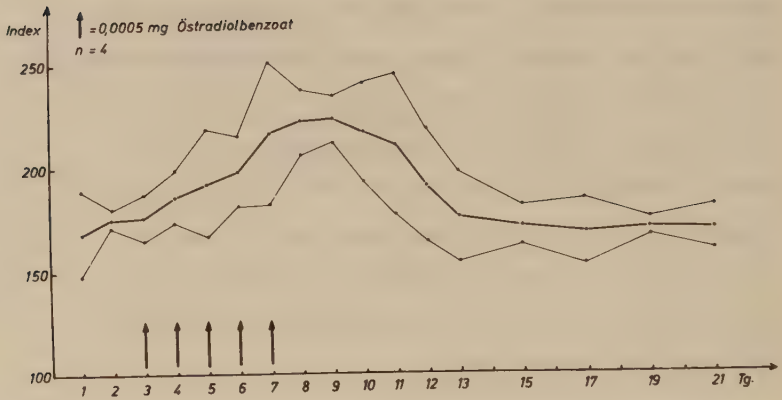


Abb. 1: Indexmittelwerte der ALP vor und nach Applikation von Östradiolbenzoat bei Ratten des Kollektivs I. Der 2s-Bereich ist angegeben.

Indices

Tag	I	II	III	IV
1	161	161	183	169
2	175	173	176	178
3*	169	180	181	175
4*	180	185	183	195
5*	183	185	191	211
6*	191	196	194	210
7*	204	225	199	235
8	211	230	223	220
9	224	227	225	214
10	221	229	213	201
11	223	225	204	189
12	189	199	201	171
13	175	181	185	160
14	169	175	174	165
15	165	163	179	163
16	170	166	169	171
17	162	167	173	172

Tab. II: Aktivitätsindices der ALP vor und nach
Applikation von Östradiolbenzoat (*) bei
Ratten des Kollektivs I.

Tag	$\bar{x}$	n	s	$\bar{x}+2s$	$\bar{x}-2s$
1	168	4	10	189	148
2	176	4	2	180	171
3*	176	4	6	187	165
4*	186	4	7	199	173
5*	192	4	13	218	167
6*	198	4	8	215	181
7*	218	4	17	250	182
8	221	4	8	237	205
9	223	4	6	234	211
10	216	4	12	240	192
11	210	4	17	244	176
12	190	4	14	217	163
13	175	4	11	197	153
15	171	4	5	180	161
17	168	4	8	183	152
19	169	4	2	173	165
21	169	4	5	179	158

Tab. III: Indexmittelwerte der ALP vor und nach Applikation von Östradiolbenzoat (*) bei Ratten des Kollektivs I.

Kollektiv II

Der mittlere postoperative ALP-Index beträgt 212 Index-Einheiten. Die Applikation von 0,002 mg Östradiolbenzoat hat schon nach 24 Stunden einen signifikanten mittleren Anstieg um 30 Einheiten zur Folge, der Gipfel wird mit 366 Einheiten zwei Tage nach der letzten Hormongabe erreicht. Dieser Anstieg entspricht einer Steigerung um knapp 70 Prozent, bezogen auf den Ausgangswert. Der Aktivitätsabfall bis zu den Normalwerten erfolgt innerhalb von zehn Tagen nach Erreichen des Höchstwertes.

(Abb. 2, Tab. IV und V)

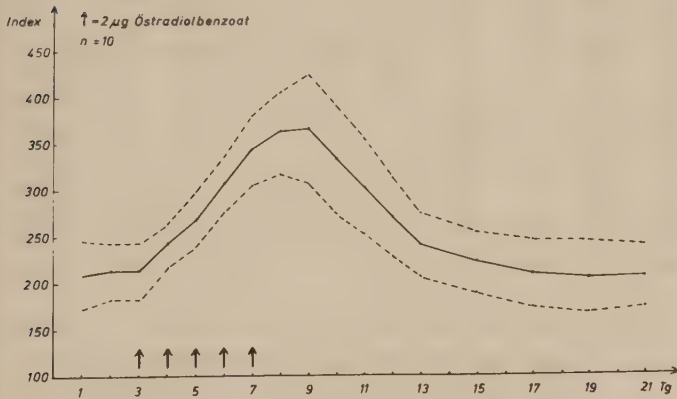


Abb. 2: Indexmittelwerte der ALP vor und nach Applikation von Östradiolbenzoat bei Ratten des Kollektivs II. Der 2s-Bereich ist angegeben.

Indices

Tag	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1	201	187	223	179	231	205	214	219	198	234
2	205	193	221	185	239	212	217	221	209	225
3*	208	192	224	183	233	211	219	220	208	228
4*	240	238	239	225	267	234	245	243	232	252
5*	273	261	251	267	291	255	281	275	249	288
6*	302	297	279	295	322	316	319	328	304	313
7*	348	333	304	325	371	360	354	347	341	346
8	323	346	343	351	382	379	367	398	369	369
9	295	348	369	355	396	383	365	393	373	385
10	258	320	377	333	341	356	329	362	341	349
11	244	295	285	299	332	327	298	326	315	319
12	230	267	254	247	285	295	273	287	279	283
13	214	244	233	225	231	261	241	239	243	274
15	196	211	217	210	251	242	219	227	217	229
17	198	197	192	193	243	217	217	208	201	238
19	195	185	203	181	229	206	210	215	203	241
21	199	186	213	183	228	207	209	213	200	235

Tab. IV: Aktivitätsindices der ALP vor und nach Applikation von Östradiolbenzoat (*) bei Ratten des Kollektivs II.

Tag	$\bar{x}$	n	s	$\bar{x}+2s$	$\bar{x}-2s$
1	209	10	18	246	172
2	213	10	16	244	181
3*	213	10	16	244	181
4*	242	10	12	265	218
5*	269	10	15	299	239
6*	308	10	15	337	278
7*	343	10	19	381	305
8	363	10	22	407	319
9	366	10	29	425	307
10	333	10	29	391	275
11	304	10	26	357	251
12	270	10	21	311	229
13	240	10	17	275	206
15	222	10	16	254	190
17	210	10	18	247	174
19	207	10	18	244	170
21	207	10	16	240	174

Tab. V: Indexmittelwerte der ALP vor und nach Applikation von Östradiolbenzoat (*) bei Ratten des Kollektivs II.

Kollektiv III

Vor der Verabfolgung von 0,002 mg Östradiolbenzoat gemeinsam mit 1,0 mg Progesteron beträgt der mittlere ALP-Index 205 Einheiten. Das Maximum wird mit einem Mittelwert von 226 Einheiten am vierten Tag der Hormonapplikation erreicht. Diese geringfügig vermehrte Enzym-Aktivität ist innerhalb von weiteren sechs Tagen in den Normbereich abgefallen.

(Abb. 3, Tab. VI und VII)

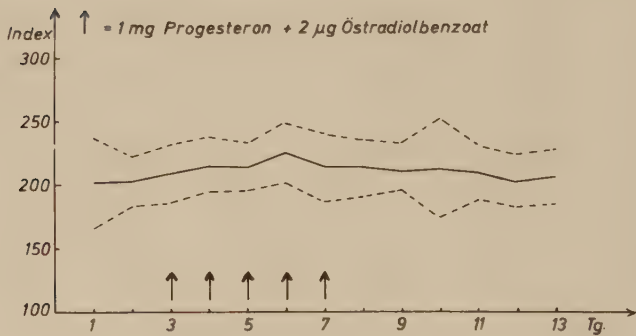


Abb. 3: Indexmittelwerte der ALP vor und nach Applikation von Östradiolbenzoat gemeinsam mit Progesteron bei Ratten des Kollektivs III. Der 2s-Bereich ist angegeben.

Indices

Tag	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1	227	203	199	183	213	230	205	185	179	193
2	214	207	203	187	205	212	214	191	193	199
3*	219	215	217	201	212	221	219	193	189	206
4*	230	211	205	203	221	233	225	214	205	221
5*	217	201	222	197	215	223	219	223	209	223
6*	229	214	219	208	222	245	231	230	216	241
7*	205	206	208	213	218	237	201	227	198	229
8	198	199	210	204	216	231	209	228	216	221
9	211	195	210	196	208	229	219	225	206	209
10	235	221	199	188	203	251	205	219	196	212
11	209	209	213	200	211	232	197	222	198	206
12	205	213	205	202	203	219	183	205	189	201
13	219	205	203	198	215	227	193	197	201	202

Tab. VI: Aktivitätsindices der ALP vor und nach Applikation von Östradiolbenzoat (*) gemeinsam mit Progesteron (*) bei Ratten des Kollektivs III.

Tag	$\bar{x}$	n	s	$\bar{x}+2s$	$\bar{x}-2s$
1	202	10	18	237	166
2	203	10	10	222	183
3*	209	10	11	232	186
4*	217	10	11	238	195
5*	215	10	9	234	196
6*	226	10	12	249	202
7*	214	10	13	240	188
8	213	10	11	236	191
9	210	10	12	233	187
10	213	10	19	251	175
11	210	10	11	231	188
12	203	10	10	223	182
13	206	10	11	228	184

Tab. VII: Indexmittelwerte der ALP vor und nach Applikation von Östradiolbenzoat (*) gemeinsam mit Progesteron (*) bei Ratten des Kollektivs III.

Kollektiv IV

Die Applikation von 1 ml Olivenöl über fünf Tage hat keine signifikante Aktivitätsänderung der ALP zur Folge.

(Abb. 4, Tab. VIII und IX)

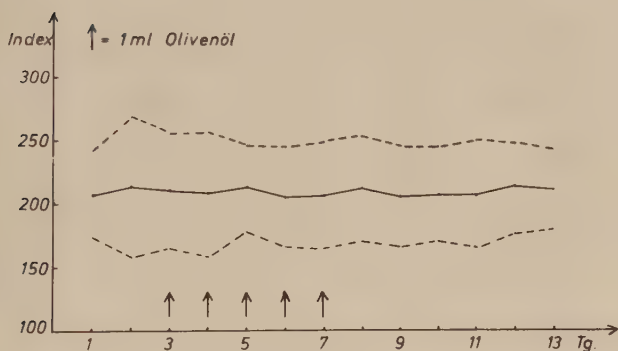


Abb. 4: Indexmittelwerte der ALP vor und nach Applikation von Olivenöl bei Ratten des Kollektivs IV. Der 2s-Bereich ist angegeben.

Indices

Tag	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1	188	201	196	225	193	227	189	235	205	213
2	201	189	199	251	179	231	206	265	201	221
3*	193	205	189	241	175	222	194	245	219	219
4*	184	199	197	245	181	230	186	243	198	218
5*	193	212	207	236	199	228	193	237	221	205
6*	197	196	183	231	192	214	184	238	220	207
7*	198	198	205	239	180	234	181	225	215	201
8	201	204	197	249	201	235	179	229	218	212
9	192	189	198	241	193	211	183	232	203	227
10	196	195	188	229	189	216	189	236	216	229
11	187	203	197	229	190	212	185	251	212	219
12	195	202	212	235	195	219	194	248	219	215
13	200	199	198	231	198	222	196	239	214	217

Tab. VIII: Aktivitätsindices der ALP vor und nach Applikation von Olivenöl (*) bei Ratten des Kollektivs IV.

Tag	$\bar{x}$	n	s	$\bar{x}+2s$	$\bar{x}-2s$
1	207	10	17	241	173
2	214	10	27	269	159
3*	210	10	23	256	164
4*	208	10	24	256	160
5*	213	10	17	246	180
6*	206	10	19	244	168
7*	208	10	20	248	167
8	212	10	21	254	171
9	207	10	20	247	167
10	208	10	19	246	170
11	209	10	21	250	167
12	213	10	18	249	177
13	211	10	16	243	180

Tab. IX: Indexmittelwerte der ALP vor und nach Appli-
kation von Olivenöl (*) bei Ratten des
Kollektivs IV.

Kollektiv V

Der mittlere Ausgangsindex der ALP beträgt bei den männlichen Ratten 156 Index-Einheiten. 24 Stunden nach der ersten Hormoninjektion steigt die Enzymaktivität schon deutlich an und erreicht ihr Maximum am Tag der letzten Injektion. Das mittlere Indexmaximum liegt bei 415 Index-Einheiten; das bedeutet eine signifikante Aktivitätssteigerung gegenüber dem Ausgangswert um nahezu 170 Prozent. Der Ausgangswert wird erst vierzehn Tage nach der letzten Injektion wieder erreicht.

(Abb. 5, Tab. X und XI)

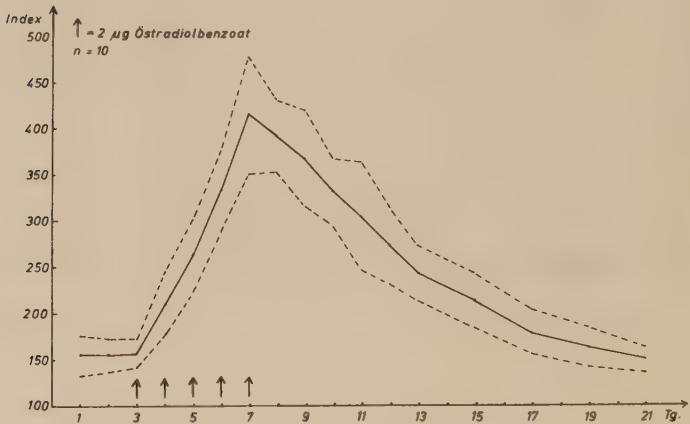


Abb. 5: Indexmittelwerte der ALP vor und nach Applikation von Östradiolbenzoat bei Ratten des Kollektivs V. Der 2s-Bereich ist angegeben.

Indices

Tag	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1	168	172	143	148	157	148	167	157	142	149
2	167	173	153	151	151	151	159	154	143	154
3*	171	168	154	153	162	154	161	156	147	148
4*	205	230	238	198	226	211	201	212	196	187
5*	246	264	302	251	287	246	251	264	267	242
6*	305	334	373	305	334	318	349	348	355	319
7*	395	410	486	368	387	401	425	430	418	432
8	381	375	431	355	403	395	401	398	390	388
9	356	331	431	347	378	355	364	371	374	367
10	325	318	371	345	326	302	318	323	342	342
11	294	260	364	322	280	312	278	325	305	308
12	252	241	314	287	257	276	259	282	273	281
13	218	220	267	247	231	248	240	252	249	246
15	208	215	246	223	200	209	211	203	223	197
17	174	178	193	184	181	173	187	178	195	156
19	164	161	174	169	166	163	165	142	173	146
21	154	141	151	155	157	154	156	147	149	141

Tab. X: Aktivitätsindices der ALP vor und nach Appli-
kation von Östradiolbenzoat (*) bei Ratten
des Kollektivs V.

Tag	$\bar{x}$	n	s	$\bar{x}+2s$	$\bar{x}-2s$
1	155	10	11	177	133
2	156	10	9	173	138
3*	157	10	8	173	141
4*	210	10	16	243	178
5*	262	10	19	301	223
6*	334	10	22	379	289
7*	415	10	32	479	351
8	392	10	20	432	352
9	367	10	26	420	315
10	331	10	19	370	293
11	305	10	29	363	246
12	272	10	21	314	230
13	242	10	15	272	212
15	213	10	15	242	183
17	180	10	11	202	158
19	162	10	11	183	141
21	151	10	6	162	139

Tab. XI: Indexmittelwerte der ALP vor und nach Applikation von Östradiolbenzoat (*) bei Ratten des Kollektivs V.

Kollektiv VI

Die Applikation von 0,002 mg Östradiolbenzoat gemeinsam mit 1,0 mg Progesteron an fünf aufeinanderfolgenden Tagen bewirkt nur sehr geringe Aktivitätsschwankungen. Der mittlere Ausgangswert beträgt 155 Index-Einheiten. Der Maximalwert liegt bei 163 Einheiten und wird am zweiten und dritten Tag der Hormonapplikation erreicht.

(Abb. 6, Tab. XII und XIII)

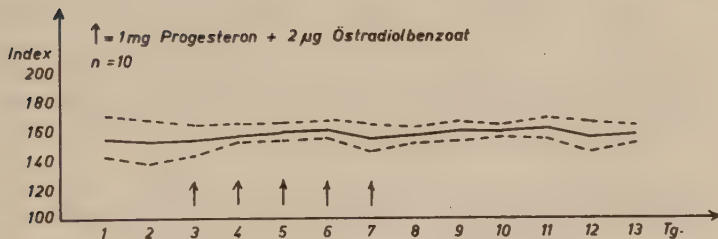


Abb. 6: Indexmittelwerte der ALP vor und nach Applikation von Östradiolbenzoat gemeinsam mit Progesteron bei Ratten des Kollektivs VI. Der 2s-Bereich ist angegeben.

Indices

Tag	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1	154	153	149	155	168	156	148	158	155	168
2	153	159	144	149	160	148	151	154	148	170
3*	160	159	150	156	163	151	149	151	149	153
4*	161	163	155	160	156	157	160	159	153	157
5*	157	163	155	161	159	157	163	160	158	159
6*	160	159	162	157	169	160	159	165	155	161
7*	153	154	149	160	161	155	157	151	157	149
8	157	160	153	158	157	157	153	159	158	153
9	155	156	160	161	154	165	160	161	163	159
10	160	161	155	156	160	161	161	159	156	161
11	163	159	161	158	162	160	159	158	170	160
12	158	157	154	147	161	155	157	163	149	158
13	155	158	164	160	159	156	158	157	153	154

Tab. XII: Aktivitätsindices vor und nach Applikation
von Östradiolbenzoat (*) gemeinsam mit Pro-
gesteron (*) bei Ratten des Kollektivs VI.

Tag	$\bar{x}$	n	s	$\bar{x}+2s$	$\bar{x}-2s$
1	156	10	7	170	143
2	154	10	8	169	138
3*	154	10	5	164	144
4*	158	10	3	164	152
5*	158	10	8	174	142
6*	160	10	3	166	154
7*	155	10	4	163	146
8	157	10	3	162	151
9	159	10	4	166	152
10	160	10	2	164	154
11	162	10	4	170	153
12	156	10	6	168	145
13	157	10	3	164	151

Tab. XII: Indexmittelwerte der ALP vor und nach Applikation von Östradiolbenzoat (*) gemeinsam mit Progesteron (*) bei Ratten des Kollektivs VI.

Kollektiv VII

Die Injektion von reinem Olivenöl hat wie bei dem weiblichen Vergleichskollektiv IV keinerlei Effekt auf die Aktivität der Phosphatase.

(Tab. XIV und XV)

Indices

Tag	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1	132	133	145	125	121	139	122	120	130	135
2	135	120	133	128	129	135	120	124	151	125
3*	134	126	148	136	136	131	113	133	159	122
4*	130	145	129	125	140	128	128	121	131	121
5*	120	116	152	121	135	124	134	131	148	126
6*	139	130	138	133	140	122	128	131	142	130
7*	133	125	138	132	139	125	125	129	140	130
8	135	130	134	137	136	123	127	127	135	127
9	131	127	139	135	142	127	125	130	139	131
10	132	134	141	124	139	123	125	133	135	129
11	135	127	139	134	132	125	124	131	129	131
12	131	129	137	138	135	130	131	135	133	134
13	133	130	135	135	132	127	133	137	136	132

Tab. XIV: Aktivitätsindices vor und nach Applikation
von Olivenöl bei Ratten des Kollektivs VII.

Tag	$\bar{x}$	n	s	$\bar{x}+2s$	$\bar{x}-2s$
1	130	10	8	147	114
2	130	10	9	148	112
3*	134	10	13	160	108
4*	130	10	8	145	115
5*	131	10	12	154	107
6*	133	10	7	146	120
7*	132	10	6	143	120
8	131	10	5	141	121
9	133	10	6	144	121
10	132	10	6	144	119
11	131	10	5	140	121
12	133	10	3	139	127
13	133	10	3	139	127

Tab. XV: Indexmittelwerte der ALP vor und nach Appli-
kation von Olivenöl (*) bei Ratten des
Kollektivs VII.

6.0 Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß die exogene Zufuhr von Östradiolbenzoat sowohl bei männlichen Ratten als auch bei hysterektomierten und ovariectomierten Rattenweibchen eine vermehrte Aktivität der alkalischen Leukozytenphosphatase bewirkt.

Dieses Ergebnis bestätigt auch im Tierversuch die beim Menschen beschriebene erhöhte ALP-Aktivität nach Östrogeneinfluß (4, 9, 28, 35, 39, 41, 61).

Das erste Kollektiv zeigt unter der Gabe von 0,0005 mg Östradiolbenzoat eine mittlere maximale Steigerung der ALP um knapp 30 Prozent. Bei Kollektiv II hingegen läßt sich nach Applikation der vierfachen Dosis eine maximale Steigerung um etwa 70 Prozent ausgehend vom Normalwert feststellen.

Bezogen auf Körpergewicht und Körperoberfläche entspricht die Menge von 0,002 mg Östradiolbenzoat der Substitutionsmenge, die Patientinnen nach Ovariectomie verabfolgt wird (54).

Die geringere maximale Steigerung der ALP-Aktivität ließe sich dem Befund beim Menschen entsprechend demnach als Dosisproblem deuten.

Levine (28) untersuchte die ALP-Aktivität bei ovariektomierten Patientinnen und solchen mit Hypogonadismus und stellte in beiden Fällen erniedrigte ALP-Indices fest.

Überträgt man dieses Ergebnis auf die vorliegenden Tierversuche, so ist anzunehmen, daß die exogene Zufuhr von 0,0005 mg Östradiolbenzoat als Substitutionsdosis zu niedrig ist, um die physiologische Reaktion der Phosphatase in vollem Ausmaß zu bewirken.

Dieser Vermutung stehen die Untersuchungsergebnisse von Bailer (2) entgegen, dem es nicht gelang, auch mit der zweieinhalb verstärkten Hormon-Dosis in Versuchen an Kaninchen eine verstärkte Enzymaktivität auszulösen.

Der Frage, ob Östrogenspiegel, die über dem physiologischen Normbereich liegen, in der Lage sind, die Phosphatase-Aktivität über das in der vorliegenden Arbeit erreichte Ausmaß hinaus zu steigern, sollte in weiteren Untersuchungen nachgegangen werden, da im Rahmen dieser Arbeit auf das quantitative Problem nicht näher eingegangen wurde.

Die Östradiolgabe von 0,002 mg, die bei Rattenweibchen des Kollektivs II eine maximale Indexsteigerung um annähernd 70 Prozent hervorrief, erzielte bei den männ-

lichen Ratten des Kollektivs V eine maximale Index-Steigerung um nahezu 170 Prozent, ausgehend vom Normalwert. Borel et al. (9) beschreibt eine ähnlich starke ALP-Aktivitätsvermehrung bei Männern nach Verabfolgung von Östradiol.

Eine Erklärung für diese offensichtlich geschlechtsspezifische Reaktion der Phosphatase unter Östrogeneinfluß wurde bisher nicht gefunden.

Der Kurvenvergleich der Kollektive I, II und V ergibt im Verlaufsbild außer der quantitativen auch eine zeitliche Verschiebung der Maximalwerte und eine unterschiedlich schnelle Rückkehr zu den Ausgangswerten.

Der höchste ALP-Indexmittelwert wird von den Kollektiven I und II am zweiten Tag nach der letzten Injektion erreicht, Kollektiv V erreicht den Maximalwert schon am Tag der letzten Hormonapplikation.

Dieses Ergebnis spricht außer der vorher beschriebenen verstärkten Reaktion auch für eine beschleunigt ablaufende Reaktion der ALP im Organismus der männlichen Ratte im Gegensatz zu der bei weiblichen Tieren.

Die Normalwerte werden beim Kollektiv I schon nach vier Tagen, beim Kollektiv II nach zehn Tagen und beim Kollektiv V erst nach vierzehn Tagen wieder erreicht.

Weder bei den weiblichen Versuchstieren des Kollektivs III, noch bei den männlichen Ratten des Kollektivs VI bewirkt die gemeinsame Verabfolgung von Östradiolbenzoat und Progesteron in physiologischen Dosen eine signifikante Aktivitätsänderung der ALP (Abb. 3 und 6). Polishuk et al. (39) kommen beim Menschen ebenfalls zu dem Ergebnis, daß Östrogenzufuhr allein einen ALP-Anstieg hervorruft, gleichzeitige Applikation von Östrogen und Progesteron aber keinen signifikanten Anstieg der Enzymaktivität bewirkt.

Offenbar besitzt Progesteron in der physiologischen Dosierung eine Anti-Östrogenwirkung und vermag aufgrund dessen die aktivitätssteigernde Wirkung des Östrogens auf die ALP zu neutralisieren.

Somit läßt sich der von Ebadi und Mc Coy (12) ebenfalls im Tierexperiment festgestellte Aktivitätsanstieg der Phosphatase unter Progesteroneinfluß nicht bestätigen.

Das Gonadal-Endokrinium kann in Bezug auf seine Wirkung auf die ALP-Aktivität nicht aus dem funktionellen Regelkreis Zwischenhirn, Hypophyse, Schilddrüse und Nebennierenrinde herausgelöst betrachtet werden. Nach den bislang vorliegenden Untersuchungen ist es nicht möglich zu entscheiden, ob Östradiolbenzoat die Enzym-Aktivitätszunahme direkt bewirkt oder lediglich aktivitätsfördernd in diesen Regelkreis eingreift. Bedenkt man das enge funktionelle Zusammenspiel zwischen Ovar- und Interrenal-Endokrinium so ist es vorstellbar, daß Östradiolbenzoat seinen Einfluß auf die alkalische Leukozytenphosphatase über die Nebennierenrindenhormone als Mittler ausübt. Für eine indirekte Beeinflussung der ALP durch Östradiolbenzoat sprechen auch die Untersuchungen von Bailer (2), der in vitro durch dieses Hormon keine Aktivitätszunahme auszulösen vermochte.

7.0 Zusammenfassung

Die bisher auf dem Gebiet der Geburtshilfe und Frauenheilkunde erschienenen Publikationen über das Verhalten der alkalischen Leukozytenphosphatase (ALP) unter physiologischen Umständen und bei Erkrankungen haben sich mit der Frage befaßt, ob und in welchem Ausmaß die weiblichen Geschlechtshormone einen Einfluß auf die Aktivität dieses Enzyms ausüben.

Da diese Untersuchungen - sowohl den Menschen betreffend als auch im Tierexperiment - zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt haben, ging es in der vorliegenden Untersuchung darum zu prüfen, wie sich die exogene Applikation von Östradiolbenzoat allein und gleichzeitig mit Progesteron bei der männlichen und der hysterektomierten und ovariectomierten weiblichen Ratte auf die Enzymaktivität der ALP auswirkt.

Der Nachweis der Phosphatase-Aktivität erfolgte zytochemisch mit Hilfe des Azo-Kupplungsverfahrens nach Merker und Heilmeyer, modifiziert nach Bauer-Sic.

Als Versuchstiere wurden 67 gleichaltrige Albino-ratten desselben Stammes benutzt, die unter den gleichen Versuchsbedingungen gehalten wurden.

Die 36 weiblichen Ratten werden vor Beginn der Untersuchung in Äthernarkose hysterektomiert und ovariectomiert.

Die Tiere werden in Kollektive von jeweils zehn Ratten eingeteilt.

Nachdem der Normalwert der ALP-Aktivität bei jeder Ratte bestimmt ist, wird Östradiolbenzoat unterschiedlicher Dosierung allein und in Kombination mit Progesteron jeweils einem Kollektiv aus weiblichen und männlichen Ratten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen subkutan injiziert.

Die alleinige Applikation von Östradiolbenzoat führt sowohl bei den weiblichen, als auch bei den männlichen Ratten zu einem signifikanten Anstieg der ALP-Aktivität. Die kombinierte Verabfolgung von Östradiolbenzoat gemeinsam mit Progesteron ruft weder bei den weiblichen noch bei den männlichen Tieren einen signifikanten Aktivitätsanstieg der ALP hervor. Progesteron wirkt demnach auch in Bezug auf die ALP als Antiöstrogen.

Die Untersuchungen lassen keine Schlüsse darüber zu, ob Östradiolbenzoat auf direktem oder indirektem Wege auf die ALP einwirkt. Da das Gonadal-Endokrinium einen Teil des funktionellen Regelkreises Zwischenhirn, Hypophyse, Schilddrüse und Nebennierenrinde darstellt, sind auch andere Angriffspunkte des Östradiolbenzoats zur Auslösung der ALP-Aktivitätszunahme denkbar.

8.0 Literaturverzeichnis

1. ALTER, A. A., S. L. LEE, M. POURFAR, G. DOBKIN:
Studies of Leukocyte Alkaline Phos-
phatase in Mongolism:
A Possible Chromosome Marker.
Blood, Vol. 22, 2 (1963), 165
2. BAILER, P. Hormonabhängiges Verhalten der alka-
lischen Leukozytenphosphatase.
Blut (1970), im Druck
3. BAILER, P., H. RÖHR: Das Verhalten der alkalischen
Leukozytenphosphatase bei der Ratte
nach Applikation von thyreotropem
Hormon und weiblichen Geschlechts-
hormonen.
Blut (1970), im Druck
4. BARNETT, R. J., A. M. SELIGMAN: Histochemical
demonstration of esterase by pro-
duction of indigo.
Science 114 (1951), 579
5. BAUER-SIC, P.: Signifikante Veränderungen des Alka-
lischen Leukozytenphosphatase-Index
während des menstruellen Zyklus.
Acta endocr. 52 (1966), 130

6. BENNETT, J. M., L. NATHANSON, A. M. RUTENBURG:
Significance of Leukocyte Alkaline
Phosphatase in Hodgkin's Disease.
Arch. intern. Med. Vol. 121 (1968),
338
7. BERRETTA, L. R.: Sul valore semeiologico della fos-
fatasi alcalina leucocitaria nella
diagnosi di gravidanza ectopica.
Minerva ginec. (Torino) 14 (1962),
1138
8. BESSEY, O. A., O. H. LOWRY, M. J. BROCK:
A method for the rapid determination
of alkaline phosphatase with five
cubic millimeters of serum.
J. biol. Chem. 164 (1964), 321
9. BOREL, C., J. FREI, A. VANOTTI:
Leucocyte metabolism in pregnancy.
Acta endocr. 35 (1960), 575
10. BRESSEL, D., S. WITTE, N. HENNING: Die Bedeutung
der alkalischen Leukozytenphosphatase
bei retikulären und lymphatischen
Systemkrankheiten und bei der Lympho-
granulomatose.
Blut, Bd. VII (1961), 14

11. CLIMIE, A. R. W., W. L. HEINRICHS, I. J. FOSTER:
Neutrophilic Alkaline Phosphatase
Test.
Amer. J. Clin. Path., Vol. 38, 1
(1962), 95
12. EBADI, M., E. Mc COY: Progesterone-Mediated
Increases Of Leucocyte Alkaline
Phosphatase In Rabbits.
Biochim. biophys. Acta (1966), 502
13. EMMENS, C. W., L. MARTIN: Anti-Estrogens.
In: Methods in Hormon Research,
Vol. III, S. 81, Academic Press,
New York - London, 1964
14. FIESSINGER, N., F. BOYER: Les Phosphatases des
leucocytes.
Enzymologia 1 (1936), 172
15. FLURY, R., T. WEGMANN: Das Verhalten der alkali-
schen Leukozytenphosphatase beim
Morbus Hodgkin.
Schweiz. med. Wschr. 94 (1964), 958
16. GOMORI, G.: Microtechnical demonstration of phos-
phatase in tissue sections.
Proc. Soc. exper. Biol. (N.Y.) 42
(1939), 23

17. GOMORI, G.: The distribution of phosphatase in normal organs and tissues.
J. cell. comp. Physiol. 17 (1941), 71
18. GUMBRECHT, P., A. LOESER: Die Funktion des Uterus bei der Wirkung der Ovarialhormone auf die Schilddrüse.
Arch. Gynäk. 167 (1938), 199
19. HAERING, M.: Das Verhalten der alkalischen Leukozytenphosphatase (ALP) in der Schwangerschaft, unter der Geburt und im Wochenbett.
Geburtsh. Gynäk. 2 (1964), 132
20. HOLT, S.J.: A new principle for the histochemical localization of hydrolytic enzymes.
Nature (Lond.) 169 (1952), 271
21. IMMEL, E., W. TILLING: Die alkalische Leukozytenphosphatase in der Differentialdiagnose der Lebererkrankungen.
Med. Klin. 59 (1964), 895
22. KAPLOW, L. S.: A Histochemical Procedure for Localizing and Evaluating Leukocyte Alkaline Phosphatase Activity in Smears of Blood and Marrow.
Blood, Vol. X (1955), 1023

23. KAY, H. D.: Plasma phosphatases in osteitis deformans and other diseases of bone. Brit. J. exp. Path. 10 (1929), 253
24. KEISER, G.: Die Bedeutung der alkalischen Leukozytenphosphatase. Schweiz. Med. Wschr. 97 (1967), 245
25. KOCH, E., D. REMY: Die alkalische Leukozytenphosphatase in der Differentialdiagnose hämatologischer Erkrankungen. Klin. Wschr. 1 (1960), 26
26. LAMBERS, K.: Die alkalische Phosphataseaktivität der Blutzellen bei Leukosen und anderen pathologischen Zuständen. Z. klin. Med. 155 (1958), 176
27. LAMBERS, K., P. BAUER-SIC: Hydrolytische Enzyme in der klinischen Diagnostik. In: Zyto- und Histochemie in der Hämatologie, 9. Freiburger Symposion, Hsgb. H. Merker, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1963
28. LEVINE, B., G. MANDELL, D. LIPSCHUTZ, J. BERNSTEIN: Leukozyte alkaline phosphatase in gynecologic cancer. Amer. J. Obstet. and Gynec. 95 (1966) 692-695

29. LORBACHER, P., R. FISCHER, D. SCHMÄHL: Über das Verhalten der alkalischen Leukozytenphosphatase bei experimentellen Tiertumoren. Zyto- und Histochemie in der Hämatologie. 9. Freiburger Symposion, Hsgb. H. Merker, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1963
30. MENTEN, M., J. JUNGE, M. H. GREEN: A coupling histochemical azo dye test for alkaline phosphatase in the kidney. J. biol. Chem. 153 (1944), 471
31. MERKER, H.: Die alkalische Leukozytenphosphatase und ihre diagnostische Bedeutung. Klin. Wschr. 38 (1960), 1228
32. MERKER, H., L. HEILMEYER: Die alkalische Phosphatase neutrophiler Leukozyten. Dtsch. med. Wschr. 85 (1960), 253
33. MERKER, H.: Grundlagen zur klinisch-morphologischen Blutdiagnostik mit Hydrolasen. In: Zyto- und Histochemie in der Hämatologie, 9. Freiburger Symposion, Hsgb. H. Merker, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1963

34. MÜLLER, D.: Die Aktivität der alkalischen Leukozytenphosphatase unter zytostatischer Stoßtherapie beim Malignomkranken. Med. Klin. 1 (1964), 7
35. MÜLLER, D.: Zur Frage der endokrinen Beeinflussung der alkalischen Leukozytenphosphatase. Blut, Bd. XIV (1967), 273
36. NOWICKI, L., H. WERNZE: Über die alkalische Leukozyten- und Serumphosphatase bei hepatobiliären Erkrankungen und Tumoren. Ärztl. Forsch. 4 (1965), 194
37. PLENERT, W.: Studie zur Zytochemie der Leukozytenphosphatasen im Kindesalter. III. Mitteilung: Die Beeinflussung der AGP-Aktivität durch Steroidpräparate. Folia haemat. 80 (1962), 52
38. PLENERT, W.: Zytochemie der Leukozyten im Kindesalter. Zyto- und Histochemie in der Hämatologie. 9. Freiburger Symposion, Hsgb. H. Merker, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1963

39. POLISHUK, W., H. ZUCKERMAN, Y. DIAMANT: Alkaline Phosphatase Activity in Leukocytes During Menstrual Cycle. Fert. and Steril. Vol. 19, 6 (1968), 901
40. QUIGLEY, H. J., A. DAWSON, BONG HAK HYUN, R. Ph. CUSTER: The Activity of Alkaline Phosphatase in Granular Leukocytes During Pregnancy and the Puerperium: A Preliminary Report. Amer. J. clin. Path. Vol. 33, 2 (1960), 109
41. ROSNER, F., S. L. LEE: Endocrine Relationship of Leukocyte Alkaline Phosphatase. Blood Vol. 25, 3 (1965), 356
42. ROSSITER, R. J.: Effect of surface-active substances on liberation of enzymes from rabbit polymorphonuclear leucocytes. J. Physiol. 108 (1949), 14
43. SADOVSKY, E., Y. Z. DIAMANT, H. ZUCKERMAN, W. Z. POLISHUK: Leukocyte Alkaline Phosphatase In Pre-Eclampsia. J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth. 76 (1969), 538

44. SAMMOUR, M. B., S. O. HILAL: Alkaline phosphatase activity of polymorphonuclear leukocytes in relation to oral contraception.
45. SCHUHMACHER, K.: Die Bedeutung der alkalischen Leukozytenphosphatase für Differentialdiagnose und Prognose maligner Hämoblastosen.
Med. Welt 9 (1964), 1
46. SRAMKOVA, L., H. GRANTOVA, E. MILEK: Die alkalische Leukozytenphosphatase bei Masern.
Arch. Kinderheilk. Bd. 177, 2 (1968), 192
47. SRAMKOVA, L., E. PROCHAZKOVA: Die alkalische Phosphatase in neutrophilen Leukocyten bei Infektionskrankheiten.
Schweiz. med. Wschr. 98 (1968), 1325
48. SRAMKOVA, L., E. PROCHAZKOVA, M. NOVAK: Alkalische Leukozytenphosphatase bei Meningitis und Meningoenzephalitis.
Med. Klin. 64 (1969), 1748

49. STAEMMLER, H.-J.: Die gestörte Regelung der Ovarialfunktion.
Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg,
1964
50. STAFF, W. G., R. W. BURSLEM, L. POLLER: The value of
Leucocyte alkaline phosphatase deter-
minations in the diagnosis of ectopic
pregnancy.
J. clin. Path., Bd. 16 (1963), 124
51. STOBBE, H., P. NEUMANN: Die alkalische Granulozyten-
phosphatase bei Polycythaemia vera.
Z. ges. inn. Med. 18 (1963), 925
52. SUZUKI, U., K. YOSHIMURA, K. TAKAISHI: Zitiert nach
Agus, S. G., R. P. Cox, M. J. Griffin:
Inhibition of alkaline phosphatase by
cysteine and its analogues.
Bull. Coll. Agric. Tokyo Imp. Univ. 7
(1907), 503
53. TAKAMATSU, H.: Histochemische und biochemische Stu-
dien über die Phosphatase (I).
Trans. Soc. path. jap. 29 (1939), 492

54. TRUBOWITZ, S., E. MOSCHIDES, D. FELDMANN: Alkaline Phosphatase Activity of the Polymorphonuclear Leukocyte in rapidly induced Leukopenia and Leukocytosis.
J. Lab. clin. Med. 57 (1961), 747
55. TRUBOWITZ, S., D. KIRMAN, B. MASEK: the leucocyte alkaline phosphatase in mongolism.
Lancet II (1962), 486
56. UNDRITZ, E.: Zur Aktivität der Alkalischen Phosphatase bei der chronischen myeloischen Leukämie.
Schweiz. med. Wschr. 95 (1965), 1515
57. VALENTINE, W. N., W. S. BECK: Biochemical Studies On Leucocytes. I. Phosphatase Activity in Health, Leucocytosis and Myelocytic Leucemia.
J. Lab. clin. Med. Vol 38 (1951), 39
58. VALENTINE, W. N., J. H. FOLLETTE, E. B. HARDIN, W. S. BECK, J. S. LAWRENCE: Studies on Leukocyte Alkaline Phosphatase Activity: Relation to "Stress" and Pituitary-Adrenal Activity.
J. Lab. clin. Med. 44 (1954), 219

59. VALENTINE, W. N.: The enzymes of leukocytes.
Ann. New York Acad. Sci. 59 (1955),
1003
60. VALENTINE, W. M., J. H. FOLLETTE, D. H. SOLOMON,
J. REYNOLDS: The Relationship of Leukocyte alkaline
Phosphatase to "Stress", to ACTH, and
to Adrenal 17-OH-Corticosteroids.
J. Lab. clin. Med. 49 (1957), 723
61. VANNOTTI, A.: Die enzymatische Aktivität der Leuko-
zyten in der menschlichen Physiopatho-
logie und die klinische Bedeutung der
biochemisch-analytischen und zellche-
mischen Nachweismethoden.
In: Zyto- und Histochemie in der Häma-
tologie, 9. Freiburger Symposion,
Hsgb. H. Merker, Springer, Berlin-
Göttingen-Heidelberg, 1963
62. WACHSTEIN, M.: Alkaline phosphatase activity in
normal and abnormal blood and bone
marrow smears.
J. Lab. clin. Med. 31 (1946), 1

63. WEISSEL, M.: Die alkalische Leukozytenphosphatase.
II. Mitteilung: Das Verhalten der alkalischen Leukozytenphosphatase bei verschiedenen Krankheiten.
Z. ges. inn. Med. 13 (1963), 577
64. WILLIAMS, M. J., J. L. MENDEL: Studies on the alkaline and acid phosphatase content of leukocytes in various hematological disorders.
Tex. Rep. Biol. Med. 12 (1954), 429
65. WILTSHAW, E., W. C. MOLONEY: Histochemical and biochemical studies on leukocyte alkaline phosphatase activity.
Blood, 10 (1955), 1120

Lebenslauf

- 23.2.44 geboren in Moers
- 1950-54 ev. Diesterwegschule in Moers
- 1954-63 neusprachliches Mädchengymnasium
in Moers, Abitur
- 1963-65 Ausbildung zur Orthoptistin in der
Universitäts-Augenklinik in Gießen,
Staatsexamen
- 1965-71 Studium der Human-Medizin an der
Justus Liebig-Universität Gießen,
Staatsexamen
- 1971-72 Medizinalassistentenzeit und An-
fertigung der Dissertation

Am Ende dieser Arbeit habe ich die Freude,
Herrn Professor Dr. Peter Bailer für die
Überlassung des Themas und darüber hinaus
für die ständige Unterstützung sehr herzlich
zu danken.

